P03188 / 1030866-1

この添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

製造販売承認番号： 22500AMX01397000

＊2015 年 4 月改訂 （第 2 版）
2013 年 10 月作成 （第 1 版）

組織検査用腫瘍マーカーキット

ダコ Envision FLEX-ER（EP1）

【全般的な注意】

1. 本製品は，体外診断用医薬品でありそれ以外の目的に使用しないこと。
2. 本添付文書に記載された使用方法及び使用目的以外の使用については、染色結果の信頼性を保証できないので、記載内容に従って使用すること。
3. 検出結果に基づく臨床診断は，臨床症状や他の検査結果，最新の所見等と併せて，担当医師が総合的に判断すること。
4. 診断には他の検査も併用すること。
5. 一種類の一次抗体で判定のつかない場合は、複数の項目による検査も行うこと。
6. 他の種類の抗原賦活液や他の方法による前処理は、検出結果の再現性を損なう恐れがあるので、正確な検出結果を得るために、本添付文書に示した操作法を必ず守ること。
7. 病理組織化学染色は、染色前の病理組織切片の取扱いや作製法が、染色結果に大きく影響する。病理組織切片の不適切な作製過程（固定が不十分である、或いは過度の固定等）、凍結、融解、洗浄、乾燥、加熱、薄切、また、他の病理組織や試薬とのコンタミネーションは非特異反応や偽陽性・偽陰性結果の原因となるおそれがあるので、十分注意すること。そのため最適試薬の選択、検体組織の選別・固定・作製、検体組織スライドの作製から染色結果の判定に至るまで、熟練した者が行うこと。
8. 本製品の使用に際しては、あわせて使用する機器の添付文書および取扱説明書を参照すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

構成試薬	成分	容量			
		K8000	K8010	K8023	K8024
ブロッキング試薬	過酸化水素	3×40 mL	10×13 mL	1×40 mL	3×13 mL
ポリマー試薬	パーオキシダーゼ標識デキストラン 70 結合抗ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体 パーオキシダーゼ標識デキストラン 70 結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体	3×40 mL	10×13 mL	1×40 mL	3×13 mL
発色基質	3,3’ージアミノベンジジンテトラヒドロクロライド	3×3 mL	3×3 mL	1×3 mL	1×3 mL
基質緩衝液	過酸化水素	12×20 mL	20×13 mL	5×20 mL	7×13 mL
濃縮抗原賦活液	トリス、ＥＤＴＡ	9×30 mL	9×30 mL	3×30 mL	3×30 mL
濃縮洗浄液	トリス、Ｔｗｅｅｎ20	4×1 L	4×1 L	2×1 L	2×1 L
一次抗体	抗ヒト エストロジェン(ER)・ウサギモノクローナル抗体 （産生細胞の名称：EP1）	6 mL(IS084)/12 mL(IR084)			

【使用目的】

組織・細胞中のエストロジェンレセプター(ER)の検出（悪性腫瘍診断の補助等）

【測定原理】

検体中のエストロジェンレセプター(ER)に対し特異的な一次抗体（抗ヒト ER ウサギモノクローナル抗体）を反応させる。次にポリマー試薬を反応させることにより、ポリマー試薬中の抗ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体が一次抗体と反応する。更にデキストランの分子を介して、ポリマー試薬中のパーオキシダーゼが結びつき、<抗原ー ー次抗体ー抗ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体ーパーオキシダーゼ>複合体が形成される。これに基質溶液を反応させると、ポリマー試薬中のパーオキシダーゼの酵素反応によって、基質溶液中の3,3´ ージアミノベンジジンテトラヒドロクロライド(DAB)が過酸化水素により酸化されて酸化 DAB を生じ、最終的には酸化的環形成を行って、オスミウム好性可視産物が生成され、抗原部位が褐色に染色される。染色により可視化された抗原部位を光学顕微鏡にて観察する。[1-4]

【操作上の注意】

1. 病理組織は出来るだけ新鮮なものを使用すること。
2. 検体組織は「用法・用量（操作方法）2.検体の取扱い」で指示された条件下、必ずホルマリン固定液で固定したパラフィン包埋病理組織を使用すること。組織を包埋する際、パラフィン温度は 60℃以上に上げないこと。
3. ステロイドホルモン、ポリペプチド系ホルモンなど分子量の小さな物質は有機溶媒に極めて溶けやすいので、抗原の損失を防ぐ為、固定液の選択には十分注意すること。
4. パラフィンの残留はバックグラウンド染色の原因となるので、完全に除去した後に染色操作を行うこと。そのため，脱パラフィンに用いるキシレン及びエタノールは、新しいものを使用すること。
5. 検体組織スライドを脱パラフィンした後、止むを得ずすぐに染色操作に移れない場合は、洗浄液に浸し、2～8℃で保存し、少なくとも 16 時間以内には染色操作に入ること。一般的にこれ以上の長期にわたる保存は抗原性の劣化を引き起こすことが考えられているので使用しないこと。[6]
6. 固定液の種類、高濃度の固定液、長時間の固定、急激な高温処理などにより、抗原物質が変性したり、タンパク間にメチレン結合が過剰に生じて抗原が覆われたりすることがある。覆われた抗原はタンパク分解酵素処理によって露出させることが可能な場合がある。但し、タンパク分解酵素により切片がスライドガラスから剥がれやすくなる恐れがあるので、シランコートされたスライドガラスを使用すること。アルブミンスライドの使用は避けること。
7. 高濃度の固定液、長時間の固定、更にパラフィン包埋までの一連の操作により、ポリマー試薬の浸透力が低下し、反応性が低下する場合がある。反応性が低下する場合は、ポリマー試薬の反応時間を長くしたり、或いは検体を熱処理後染色操作を行うと、反応性が増加する場合がある。免疫染色に適した標本の作成法に留意すること。
8. 反応の際には、検体組織が乾かないよう注意すること。
9. 人為的に生じる染色性の低下及び偏った染色を防ぐために、余分な水分を除去し、試薬を均一に広げるように注意すること。
10. 染色中に沈殿を生じることがあっても、染色には影響を及ぼすことはないので、取り除く必要はない。
11. 検体に含まれる多量の内因性パーオキシダーゼ及びアジ化ナトリウムは、非特異的な発色を起こすことがある。
12. 薄切後の乾燥に使用する恒温槽等の機器は、必ず校正をして使用すること。

【用法・用量（操作方法）】

1. 必要な器具及び試薬

≪器具≫

・洗浄ビン　・染色パッド（熱処理用）
・ろ紙　・温浴槽或いは PT Link(CodeNo.PT10027)
・タイマー　・スライドガラス
・染色ドーゼ　(シランコーティングスライド CodeNo.S3003 又
・噴射ビン　は S4103)
・カバーグラス
・乾燥機　・免疫組織染色用マーカーペン
(ダコペン CodeNo.S2002）
・光学顕微鏡

≪試薬≫

■脱パラフィン用

(1) キシレン（JIS K8271）

(2) 100%，95%，80%，70%，50%，各エタノール

■その他

(1) 精製水

(2) 対比染色液：ヘマトキシリン

(3) 封入剤：非水溶性の永久標本用封入剤（例：エンテランニュー/マリノール）が望ましい。

(4) 一次抗体陰性コントール（例：ウサギイムノグロブリン）

≪コントロールスライド≫

■陽性コントロールスライド

陽性コントロールスライドとして、あらかじめ ER タンパク陽性であることが確認されている病理組織標本の切片スライドを用意する。このスライドを検体と並行して染色操作を行い、結果を比較する。

■陰性コントロールスライド

陰性コントロールスライドとして、あらかじめ ER タンパク陰性であることが確認されている病理組織標本の切片スライドを用意する。

2. 検体の取扱い

本品はホルマリン固定パラフィン包埋した病理組織標本を用いる。

≪パラフィン包埋切片の作製法≫

病理組織片は 2×2.5×0.5cm 程度以内の大きさとし、採取後ただちに、組織切片の 5～50 倍量のホルマリン固定液に浸す。この際、ホルマリン固定液に浸漬する時間は 24～48 時間以内が望ましい。特に 3 日以上固定した症例に関しては、染色結果に影響がある場合が考えられる。また、アルコール/ホルマリン混合液やその他の固定液の使用は、結果に著しい影響を与えるため使用しないこと。

病理組織ブロックは上記方法にて固定後、水洗いし、70vol%エタノールに浸す。それを順次高濃度となる系列のエタノールに浸して脱水し、更にキシレンに浸して脱アルコールした後パラフィン包埋する。包埋の際には温度が 60℃を超えないよう注意する。適切な方法で固定及び包埋した薄切前の病理組織ブロックは、15～25℃で長期間（2 年程度）保存が可能である。

≪標本の作製≫

検体組織スライド、陽性コントロールスライド、陰性コントロールスライドは同時に作製すること。パラフィン包埋ブロックはミクロトームで４μmに薄切し、スライドガラスに貼り付け、40±3℃の恒温槽内で十分に乾燥させる。組織切片作製後は抗原性保持のため 20～25℃で保管し、遅くとも 4～6 週間以内に染色を実施すること。

3. 試薬の調製法，安定性

試薬は使用前に室内温度（15～25℃）に戻しておくこと。
試薬は最適結果が得られる様に至適濃度に調製されているので，使用の際は以下（1）～（3）以外の希釈をしないこと。

(1) 基質溶液の調製法
基質緩衝液 1mL に対して、発色基質 1 滴(25～30μL)を加えて混合する。調製後の基質溶液は、2～8℃で 5 日以内に使用する。

(2) 洗浄液の調製法
濃縮洗浄液を精製水で 20 倍希釈し、洗浄液とする。
洗浄液が混濁した場合は使用せず廃棄する。調製後の洗浄液は、なるべく早く使用する。

(3) 抗原賦活液の調製法
濃縮抗原賦活液を精製水で 50 倍希釈し、抗原賦活液とする。
抗原賦活液が混濁した場合は使用せず廃棄する。調製後の抗原賦活液は、なるべく早く使用する。

(4) その他の試薬はそのまま用いる。

4. 染色操作

≪染色方法≫

必ず陽性コントロールスライド及び陰性コントロールスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を進行させること。また、一次抗体と併せて一次抗体陰性コントロールで染色操作を進行させること。

≪脱パラフィン及び抗原賦活処理≫

検体組織スライドは、染色操作前に、脱パラフィン及び抗原賦活処理を行う。
下記にPT Link（脱パラフィン、親水化、抗原賦活を１ステップで行う(3-in-1処理)ことが可能な前処理装置、ダコ社Code No. PT10027）を使用する方法を例示する。

(1) PT Linkによる 3-in-1 処理で脱パラフィン、親水化、抗原賦活処理を同時に行う方法（例）
使用に当たってはPT Linkの操作マニュアルを参照すること。
1. 組織切片が浸漬する十分な量（1.5L）の抗原賦活液をPT Linkタンクに注ぎ入れる。
2. PT Linkの予熱を65℃に設定する。
3. ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本スライドを、予熱が完了したPT Link中の抗原賦活液中に浸漬し、97℃で20分間加熱処理を行う。
4. 処理終了後、65℃に下がるまで標本スライドをPT Link中に放置する。
5. PT Linkタンクからスライドラックに設置したまま標本を取り出し、適切な容器または予備のタンクに入れた常温の洗浄液中に1～5分間浸漬する。
6. 抗原賦活処理後は速やかに染色操作に進むこと。

(2) 脱パラフィンを行った後、PT Linkによる抗原賦活処理を行う方法（例）

<脱パラフィン>
染色操作の直前に脱パラフィンを行う。検体組織スライドを以下の様に順に各液に浸す。
キシレン（100vol%）５分→キシレン（100vol%）５分→キシレン（100vol%）５分→エタノール（100vol%）３分→エタノール（100vol%）３分→エタノール（95vol%）３分→エタノール（80vol%）３分→エタノール（70vol%）３分→エタノール（50vol%）３分→精製水３分→精製水３分

<抗原賦活処理>
PT Linkによる抗原賦活処理
使用に当たってはPT Linkの操作マニュアルを参照すること。
1. 組織切片が浸漬する十分な量（1.5L）の抗原賦活液をPT Linkタンクに注ぎ入れる。
2. PT Linkの予熱を65℃に設定する。
3. ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本スライドを、予熱が完了したPT Link中の抗原賦活液中に浸漬し、97℃で20分間加熱処理を行う。
4. 処理終了後、65℃に下がるまで標本スライドをPT Link中に放置する。
5. PT Linkタンクからスライドラックに設置したまま標本を取り出し、適切な容器または予備のタンクに入れた常温の洗浄液中に1～5分間浸漬する。
6. 抗原賦活処理後は速やかに染色操作に進むこと

≪染色操作≫

■用手法による操作法
(1)検体組織スライドの過剰水分を払い落し、検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で拭きとる。
(2)ブロッキング試薬2～3滴（約100μL）で検体組織を覆い、常温で5分間反応させる。精製水で静かにすすいだ後、過剰水分を払い落し、検体組織スライドを洗浄液中に5分間浸漬する。検体組織スライドの過剰水分を払い落し、検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で拭きとる。
(3)一次抗体2～3滴（約100μL）で検体組織を覆い、常温で20分間反応させた後、洗浄液で静かにすすいで、洗浄液中に5分間、2回浸漬する。検体組織スライドの過剰水分を払い落し、検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で拭きとる。
(4)ポリマー試薬2～3滴（約100μL）で検体組織を覆い、常温で20分間反応させた後、洗浄液で静かにすすいで、洗浄液中に5分間、2回浸漬する。検体組織スライドの過剰水分を払い落し、検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で拭きとる。
(5)基質溶液100μLで検体組織を覆い、常温で10分間反応させた後、精製水で静かにすすぎ、精製水中に５分間浸漬する。
(6)対比染色液中に1～5分間浸漬し、5分間流水で洗浄して対比染色する。
■自動染色装置による操作法
使用する自動染色装置の取扱説明書を参照すること。
(1)検体組織スライド、一次抗体、ブロッキング試薬、ポリマー試薬、基質溶液、精製水、洗浄液を機器の所定位置に設置する。
(2)各染色工程の反応時間は以下をめやすに設定する。
①ブロッキング試薬：５分
②洗浄液：５分2回
③一次抗体：20分
④洗浄液：５分２回
⑤ポリマー試薬：20分
⑥洗浄液：５分２回
⑦基質溶液：10分
⑧洗浄液：５分２回
⑨対比染色液：１～５分

⑩流水にて３分間静かに洗浄する。
(3)使用する機器の取扱説明書に従って、染色操作を開始する。

≪脱水・透徹・封入≫
検体組織スライドは、対比染色操作後に、脱水・透徹・封入を行う。
(1)使用する封入剤の種類により、必要に応じて検体組織スライドを以下のように順に各液に浸漬する。
流水水洗１分→精製水１分→エタノール（50vol%）３分→エタノール（70vol%）３分→エタノール（80vol%）３分→エタノール（95vol%）３分→エタノール（100vol%）３分→エタノール（100vol%）３分→エタノール（100vol%）３分→キシレン（100vol%）３分→キシレン（100vol%）３分→キシレン（100vol%）３分
(2)封入剤で封入し、カバーガラスをかける。

検出結果の判定法及び判定に係る注意事項
検出結果の判定法[3,5]
(1)染色の判定は光学顕微鏡を用いて、組織・細胞を観察することにより行う。
(2)検体組織中に目的物質が検出される場合、陽性シグナルは一次抗体が反応した正常細胞或いは腫瘍細胞に認められ、褐色の陽性所見を呈する。
(3)検体組織中に目的物質が検出されない場合は、細胞の核は対比染色液の色に染色されるのみで、褐色の反応所見は見られない。
(4)一次抗体陰性コントロールで染色した検体組織スライドにより免疫反応性がないことを確認する。結合組織・壊死組織・白血球や赤血球に褐色の反応が見られる場合、検出結果の非特異的染色を勘案すること。
(5)検出結果は陽性或いは陰性と定性的に判定する。

判定上の注意
(1)必ず陰性コントロールスライドの染色結果と比較して、染色結果を判定すること。
(2)検体組織の壊死部分は、抗体が非特異的に結合しやすく非特異的染色の原因となり易いので、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
(3)一般的にタンパクや基質反応生成物の非免疫的結合により、偽陽性結果が観察される場合がある。偽陽性結果は赤血球による偽パーオキシダーゼ反応やサイトクロームCによる内因性パーオキシダーゼ反応によっても起きることがある。
(4)間質系の結合組織は、固定後疏水性となって抗体と結合し易くなること、陰性に帯電しているため陽性に帯電している抗体と結合し易いことなどにより、非特異的染色の原因となり易いので、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
(5)顆粒球の一部、及びマクロファージなどは細胞膜表面にFcレセプターを有するため、抗体のFc部分と結合し、抗体本来の特異的反応部位以外に染色が現れることがあるので、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
(6)HBV感染者やHBs抗原保持者の患者検体は、パーオキシダーゼによる非特異的染色を示すおそれがある。
(7)使用する核染色液の性能や反応時間の長さによって、核染色の度合が薄かったり、逆に暗青色に染まることがある。過剰、或いは不完全な核染色は、染色結果の適切な判定を損なうおそれがあるので注意すること。
(8)薄切後6週間以上経過した組織切片を用いた場合、切片中の抗原が劣化して、偽陰性染色を起こす場合がある。

【性能】

「用法・用量（操作方法）」欄の操作方法により、感度、正確性及び同時再現性の各試験を行い、「検出結果の判定法及び判定に係る注意事項」の判定基準に従って、ER タンパクの発現を判定した場合、下記の規格に適合する。

1. 感度試験
   一次抗体を用いて、予め陽性であることが確認されている組織標本の切片スライドを染色する場合、ER タンパクが検出される細胞核が褐色に染色される明らかな特異染色像が観察される。
2. 正確性試験
   予め陽性であることが確認されている組織標本の切片スライドを染色する場合、ER タンパクが検出される細胞核が褐色に染色される明らかな特異染色像が観察される。一次抗体の代わりに一次抗体陰性コントロールを用いて同時に染色を行った場合、特異染色像は観察されない。
3. 同時再現性試験
   予め陽性であることが確認されている組織標本の切片スライド３枚を同時に染色する場合、いずれのスライドにおいても ER タンパクが検出される細胞核が褐色に染色される明らかな特異染色像が観察される。
4. 相関性試験[7]

   本品と既承認品の相関性を乳がん組織等 128 例を用いて検討したところ、全体一致率 98%（陽性一致率 96%、陰性一致率 100%）を示す良好な相関性が得られた。

   また本品と他の既承認品の相関性を乳がん組織等 129 例を用いて検討したところ、全体一致率 98%（陽性一致率 98%、陰性一致率 99%）を示す良好な相関性が得られた。

【使用上又は取扱い上の注意】

取扱い上の注意

1. 検体組織検体には，HBV，HIV など，感染のおそれのあるものもあるので，取扱いには十分注意すること。
2. 検査にあたっては感染の危険を避けるため，使い捨て手袋を着用すること。
3. 試薬を口で吸い上げないこと。
4. 試薬が皮膚や粘膜に直接接触することを避けること。万一触れた場合は，多量の水で洗い流すこと。
5. 製品中の容器・付属品等は他の目的に転用しないこと。
6. 発色基質である３，３’－ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド（ＤＡＢ）は、変異原性が認められているので、取扱いに際しては非金属製のピンセット等の保護具を使用し、目や皮膚への接触を避けること。万一、皮膚に触れたり、目に入った場合は、流水で 15 分間以上洗い流し、直ちに医師の診察を受けること。
7. キットの試薬中、ブロッキング試薬、一次抗体はアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため、容器の落下・衝撃による破損がないように丁寧に取り扱うこと。

使用上の注意

1. 試薬は 2～8℃で保存すること。
2. 試薬はなるべく早く使用し，使用期限を過ぎた試薬は使用しないこと。
3. 試薬は直射日光に当てないこと。特に発色基質や基質溶液は、強い光にさらさないこと。
4. 試薬は微生物に汚染されないよう注意すること。
5. 異なるロットの試薬や他社品の試薬を混ぜて使用しないこと。
6. 使用後は，キャップを堅く締めておくこと。

廃棄上の注意 ＊

1. 検体組織に接触した器具・試薬及び試薬容器等は感染の危険性があるものとし，オートクレーブで 121℃，20 分間滅菌処理するか，または 1vol%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晩処理すること。
2. 使用後の容器を廃棄する場合には，廃棄物処理及び清掃に関する法律等の規定に従って処理すること。
3. キットの試薬中、ブロッキング試薬、一次抗体はアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため、廃棄の際は多量の水で希釈して廃棄すること。

【貯蔵方法、有効期間】

貯蔵方法：キットとして 2～8℃で保存

有効期間：21 ヵ月

【包装単位】

		Code No	包装単位
Autostainer/ Autostainer plus 用	一次抗体	IS084	30 テスト
	その他の試薬（検出系）	K8010	400-600 テスト
		K8024	125-190 テスト
Autostainer Link 用	一次抗体	IR084	60 テスト
	その他の試薬（検出系）	K8000	400-600 テスト
		K8023	125-190 テスト

【主要文献】

1. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J-R, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. Cell 1987;51:941-51.

2. Elledge RM, Fuqua SAW. Ch. 31: Estrogen and Progesterone Receptors. Diseases of the Breast. Harris et al. eds., Lippincott Williams & Wilkins 2000; 471-85.

3. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred C, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2010;134:907–22.

4. Fitzgibbons FK, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000;124:966-78.

5. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond EH, Allred C, Valenstein PN.

Recommendations for Validating Estrogen and Progesterone Receptor Immunohistochemistry Assays. Arch Pathol Lab Med 2010:134;930-35.

6. Diaz LK, Sneige N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. Adv Anat Pathol 2005;12:10-9. Review.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. CLSI document MM4-A (1-56238-396-5)-CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne, PA 19087-1898 USA 1999.

8. M3634 IHC003-D03803 Report on file.

【問い合わせ先】＊

ダコ・ジャパン株式会社　カスタマーサポート
〒108-0023
東京都港区芝浦四丁目 16 番 36 号住友芝浦ビル
TEL：03-5232-9968

【製造販売業者の名称及び住所】＊

ダコ・ジャパン株式会社
〒108-0023
東京都港区芝浦四丁目 16 番 36 号住友芝浦ビル
TEL：03-5232-9970　　FAX：03-5232-9969